

Исследование праймеров для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation

И.Г. БАШКИРОВА¹, Е.В. КАРИМОВА²,
И.П. СМЕРНОВА³

^{1,2} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

^{1,3} ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН»),
г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-3584-9130,
e-mail: smir-ip@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Одними из наиболее опасных вредных организмов для растений являются фитоплазмы. Фитопатогены из группы Apple proliferation (16SrX) вызывают фитоплазмозы у семечковых и косточковых культур, которые приводят к огромным потерям плодово-ягодной продукции по всему миру. В группу 16SrX входят, в частности, такие некультивируемые бактерии: *Candidatus Phytoplasma mali*, которая вызывает болезнь пролиферации яблони (Apple proliferation); *Candidatus Phytoplasma pyri*, которая вызывает болезнь истощения груши (Pear decline); *Candidatus Phytoplasma prunorum*, вызывающая европейскую желтуху косточковых (European stone fruit yellows). Первые два вида включены в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Несмотря на то что эти фитоплазмы входят в одну группу, им присущи разные естественные растения-хозяева, насекомые-переносчики, а также различный набор характерных симптомов у инфицированных растений. В статье приведены данные по изучению аналитических характеристик (специфичность и чувствительность) специфичных праймеров для выявления фитопатогенных микроорганизмов из группы Apple proliferation методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и для последующей видовой идентификации возбудителя заболевания пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali* с использованием специфичных праймеров методом классической ПЦР. В ходе экспериментов получены качественные специфичные продукты амплификации. Установлено, что с помощью исследуемой пары праймеров для классической ПЦР возможно диагностировать и идентифицировать возбудителя пролиферации яблони в зараженном растительном материале. В работе

Study of primers for the diagnosis of phytoplasmas from the Apple proliferation group

I.G. BASHKIROVA¹, E.V. KARIMOVA²,
I.P. SMIRNOVA³

^{1,2} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

^{1,3} Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia" (FGAOU VO "RUDN University"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-3584-9130,
e-mail: smir-ip@yandex.ru

ABSTRACT

One of the most dangerous pests for plants are phytoplasmas. Phytopathogens from the Apple proliferation group (16SrX) cause phytoplasmoses in pome and stone fruit crops, which lead to huge losses of fruit and berry products around the world. The 16SrX group includes, in particular, such uncultivated bacteria as: *Candidatus Phytoplasma mali*, causing apple proliferation; *Candidatus Phytoplasma pyri*, resulting in pear decline; *Candidatus Phytoplasma prunorum*, leading to European stone fruit yellows. The first two species are included in the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union (EAEU). Although they belong to the same group, these phytoplasmas have different natural hosts, insect vectors, and a different set of characteristic symptoms in infected plants. The article presents data on the study of the analytical characteristics (specificity and sensitivity) of specific primers for the detection of phytopathogenic microorganisms from the Apple proliferation group by real-time polymerase chain reaction (PCR) and for subsequent species identification of the causative agent of apple proliferation *Candidatus Phytoplasma mali* using specific primers classical PCR method. During the experiments, high-quality specific amplification products were obtained. It has been established that using the studied pair of primers for classical PCR, it is possible to diagnose and identify the causative agent of apple proliferation in infected plant material. In this work, the analysis of the studied specific primers was carried out using the NCBI Primer-BLAST online service. For research,

осуществлен анализ исследуемых специфичных праймеров с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST. Для проведения исследований использовали коллекцию ДНК фитоплазм из различных групп: Apple proliferation, Stolbur, Foxtail palm yellow decline, Peanut witches' broom, Elm yellows.

Ключевые слова. Фитопатоген, идентификация, ПЦР, фитоплазмозы, плодовые культуры, карантин растений.

ВВЕДЕНИЕ



итоплазмы *Candidatus* Phytoplasma mali, *Candidatus* Phytoplasma pyri, *Candidatus* Phytoplasma prunorum группы Apple proliferation (16SrX) – одни из наиболее опасных и экономически значимых фитопатогенов для плодовых и эконо-

номически значимых для сельскохозяйственных культур не только для Российской Федерации, но и для зарубежных стран (Picard et al., 2018; Bashkirova et al., 2019; gd.eppo.int). Возбудитель европейской желтухи косточковых является карантинным вредным организмом (КВО) для многих стран, например для Бахрейна, Израиля, Иордании, Канады, Молдовы, Туниса и других, а также регулируемым некарантинным вредным организмом для стран Европейского союза. Возбудители заболеваний пролиферации яблони и истощения груши относятся к КВО для Аргентины, Бахрейна, Бразилии, Молдовы, Норвегии и других стран и к карантинным вредным организмам, ограниченно распространенным на территории стран ЕАЭС (Башкирова и др., 2018b; Каримова и др., 2019; gd.eppo.int).

Фитоплазмы – фитопатогенные прокариоты рода *Candidatus* Phytoplasma внутри класса Mollicutes. Другими представителями данного класса являются микоплазмы, ахлеоплазмы, спироплазмы и иные микроорганизмы. Все известные виды из рода *Candidatus* Phytoplasma являются растительными патогенами. Они близки к бактериям из рода *Bacillus*, *Clostridium* и *Streptococcus* (Свиридова, Ванькова, 2012; Гирсова и др., 2013; МСФМ 27, 2018).

Совершенствование молекулярно-генетических методов позволило провести исследование генома этой группы микроорганизмов, определить консервативные гены и разработать более точную классификацию. Диагностика фитоплазм и их филогенетический анализ основаны на исследовании фрагментов генов 16S-23S рРНК, для которых разработан комплекс праймеров (Woese, 2000). Для предварительной классификации фитоплазм чаще всего используют генетические различия в маркере – гене 16S рРНК. Генетическое различие между представителями рода *Candidatus* Phytoplasma графически представляют в виде филогенетических деревьев (Lee et al., 2000; Jomantiene et al., 2002; Wei et al., 2008).

Для современной классификации фитоплазм используют пороговое значение сходства

we used a collection of phytoplasma DNA from various groups: Apple proliferation, Stolbur, Foxtail palm yellow decline, Peanut witches' broom and Elm yellows.

Key words. Phytopathogen, identification, PCR, phytoplasmoses, fruit crops, plant quarantine.

INTRODUCTION



hytoplasmas *Candidatus* Phytoplasma mali, *Candidatus* Phytoplasma pyri, *Candidatus* Phytoplasma prunorum of Apple proliferation group (16SrX) are one of the most dangerous and economically significant phytopathogens for fruit and economically significant for agricultural crops not only for the Russian Federation, but also for other countries (Picard et al., 2018; Bashkirova et al., 2019; gd.eppo.int). The causative agent of European stone fruit yellows is a quarantine pest for many countries, such as Bahrain, Israel, Jordan, Canada, Moldova, Tunisia and others, as well as a regulated non-quarantine pest for the countries of the European Union. The causative agents of apple proliferation and pear decline belong to quarantine pests for Argentina, Bahrain, Brazil, Moldova, Norway and other countries and to quarantine pests that are limitedly spread on the territory of the EAEU countries (Bashkirova et al., 2018b; Karimova et al., 2019; gd.eppo.int).

Phytoplasmas are phytopathogenic prokaryotes of the genus *Candidatus* Phytoplasma within the class Mollicutes. Other representatives of this class are mycoplasmas, achleoplasmas, spiroplasmas and other microorganisms. All known species of the genus *Candidatus* Phytoplasma are plant pathogens. They are close to bacteria of the genus *Bacillus*, *Clostridium* and *Streptococcus* (Sviridova, Vankova, 2012; Girsova et al., 2013; ISPM 27, 2018).

Improvement in molecular genetic methods has made it possible to study the genome of this group of microorganisms, identify conservative genes, and develop a more accurate classification. The diagnosis of phytoplasmas and their phylogenetic analysis is based on the study of 16S-23S rRNA gene fragments, for which a set of primers was developed (Woese, 2000). For the preliminary classification of phytoplasmas, genetic differences in the marker, the 16S rRNA gene, are most often used. The genetic difference between members of the genus *Candidatus* Phytoplasma is graphically represented as phylogenetic trees (Lee et al., 2000; Jomantiene et al., 2002; Wei et al., 2008).

For the modern phytoplasmas classification, a threshold similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene equal to 97.5% is used. For example, differences in the sequences of one gene region during interspecific comparison of phytoplasmas from the

нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, равное 97,5%. Например, различия в последовательностях одного участка гена при межвидовом сравнении фитоплазм из группы Apple proliferation составили: *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma pyri* – 1,0–1,1%; *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1,3–1,5% и *Candidatus Phytoplasma pyri/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1,2–1,3% (Seemüller, Schneider, 2004; IRPCM, 2004). По сравнению с видами из рода *Bacillus* фитоплазмы имеют небольшой геном: он состоит из 680–1600 тысяч пар нуклеотидов (Duduk, 2009).

Фитоплазмы переносятся с помощью насекомых из отряда Homoptera, подотрядов Psyllinea, Cicadinea, или Auchenorrhyncha. Доказано, что распространение возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali* – осуществляется видами *Cacopsylla picta* Foerster (синоним *C. costalis*), *C. melanoneura* (Foerster, 1848) и *Fieberiella florii* (Stål, 1864) (Mehle et al., 2011). Насекомые-переносчики распространены в Республике Крым, на Северном Кавказе, на юге Иркутской области и на территории СНГ (Приходько, Матяшова, 2015). *Candidatus Phytoplasma pyri*, возбудитель истощения груши, переносится с помощью *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758), *C. pyrisuga* (Foerster, 1848) и *Psylla pyricola* (Foerster, 1848). Эти виды выявлены на территории Дальнего Востока, Северного Кавказа и СНГ (Матяшова, Морозова, 2016; Башкирова и др., 2018а). В естественных условиях переносчиком возбудителя европейской желтухи косточковых – *Candidatus Phytoplasma prunorum* – является *C. pruni* (Scopoli, 1763) (Weintraub, Beanland, 2006), который распространен в Республике Крым и на Южном Кавказе (Шнейдер и др., 2017). К характерным симптомам заражения фитоплазмами из группы Apple proliferation относятся: ветвящиеся побеги «ведьмины метлы», мелкие листья с увеличенными прилистниками, пожелтение и покраснение листьев, скручивание и хлоротизация листьев, некроз флоэмы (рис. 1).

Для диагностики и идентификации возбудителей фитоплазмозов из группы Apple proliferation используют современные молекулярно-генетические методы (МСФМ 27, 2018). В данной работе проводили изучение фитопатогенов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* с использованием праймеров, рекомендованных в публикациях Nikolić et al. (2010), Mehle et al. (2013), Jarausch et al. (1994), на основе изучения фрагментов генов 16S-23S рРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали ДНК фитоплазм из различных коллекций: 1) *Candidatus Phytoplasma mali*; 2) *Candidatus Phytoplasma pyri*; 3) *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 4) *Candidatus Phytoplasma solani*; 5) *Candidatus Phytoplasma asteris*; 6) *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7) *Candidatus Phytoplasma rubi*.

Из зараженного растительного материала осуществляли экстракцию ДНК фитопатогенов *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* коммерческими наборами «ЦитоСорб/СytoSorb» и «Сорб-ГМО-Б» (ООО «Синтол», Россия).

Apple proliferation group were: *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma pyri* – 1.0–1.1%; *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1.3–1.5% and *Candidatus Phytoplasma pyri/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1.2–1.3% (Seemüller and Schneider, 2004; IRPCM, 2004). Compared to species of the genus *Bacillus*, phytoplasmas have a small genome: it consists of 680–1600 base pairs (Duduk, 2009).

Phytoplasmas are transmitted by insects from the order Homoptera, the suborders Psyllinea, Cicadinea, or Auchenorrhyncha. It has been proven that the spread of the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*, is carried out by the species *Cacopsylla picta* Foerster (synonym of *C. costalis*), *C. melanoneura* (Foerster, 1848), and *Fieberiella florii* (Stål, 1864) (Mehle et al., 2011). Insect vectors are common in the Republic of Crimea, in the North Caucasus, in the south of Irkutsk Oblast and in the CIS (Prikhodko and Matyashova, 2015). *Candidatus Phytoplasma pyri*, the causative agent of pear decline, is transmitted by *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758), *C. pyrisuga* (Foerster, 1848) and *Psylla pyricola* (Foerster, 1848). These species have been identified in the Far East, North Caucasus, and the CIS (Matyashova and Morozova, 2016; Bashkirova et al., 2018a). In natural conditions, the vector of European stone fruit yellows, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, is *C. pruni* (Scopoli, 1763) (Weintraub, Beanland, 2006), which is spread in the Republic of Crimea and the South Caucasus (Shneyder et al., 2017). The characteristic symptoms of infection with phytoplasmas from the Apple proliferation group include: branching shoots of the “witch’s broom”, small leaves with enlarged stipules, yellowing and reddening of the leaves, twisting and chloritization of the leaves, and phloem necrosis (Fig. 1).

For the diagnosis and identification of pathogens of phytoplasmoses from the Apple proliferation group, modern molecular genetic methods are used (ISPM 27, 2018). In this work, the study of phytopathogens *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* was carried out using primers recommended in the publications of Nikolić et al. (2010), Mehle et al. (2013), Jarausch et al. (1994), based on the study of 16S-23S rRNA gene fragments.

MATERIALS AND METHODS

The experiments used phytoplasma DNA from different collections: 1) *Candidatus Phytoplasma mali*; 2) *Candidatus Phytoplasma pyri*; 3) *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 4) *Candidatus Phytoplasma solani*; 5) *Candidatus Phytoplasma asteris*; 6) *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7) *Candidatus Phytoplasma rubi*.

DNA of phytopathogens *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* was extracted from infected plant material with commercial kits CytoSorb and Sorb-GMO-B (Syntol, Russia).

To diagnose phytoplasmas from the Apple proliferation group by real-time PCR (RT-PCR), specific F/R



Рис. 1. Симптомы покраснения листьев груши, вызванные заражением *Candidatus Phytoplasma pyri* (фото И.Г. Башкировой)

Fig. 1. Symptoms of reddening of pear leaves caused by infection with *Candidatus Phytoplasma pyri* (photo by I.G. Bashkirova)

Для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали специфичные праймеры F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013):

прямой праймер (F):

5' -TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3' ,

обратный праймер (R):

5' -TCCACTGTGCGCCCTTAATT-3' .

Для проверки работы праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) использовали 2,5-кратную реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green (ООО «Синтол»).

Для идентификации возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali* – методом классической ПЦР использовали пару праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994):

прямой праймер (AP5):

5' -TCTTTTAATCTTCAACCATGGC-3' ,

обратный праймер (AP4):

5' -CCAATGTGTGAAATCTGTAG-3' .

Величина продукта амплификации с праймерами AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) составляет около 483 пар нуклеотидов (п. н.). Использовали реакционную смесь (Mix) 5x Mas^{DD}Taq Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия).

Пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Россия) и предоставлены в лиофилизированном виде. Рабочая концентрация для праймеров составила 10 пикомоль/мкл. Проводили анализ пар праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), изучали их аналитические характеристики (специфичность и чувствительность).

Состав рабочей реакционной смеси для проведения метода ПЦР (табл. 1) рассчитывали на количество исследуемых образцов и на отрицательный

праймеры were used (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013):

forward primer (F):

5' -TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3' ,

reverse primer (R):

5' -TCCACTGTGCGCCCTTAATT-3' .

To test the performance of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), a 2.5-fold reaction mixture was used for real-time PCR in the presence of EVA Green dye (Syntol).

To identify the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*, by classical PCR, a pair of primers AP5/AP4 was used (Jarausch et al., 1994):

forward primer (AP5):

5' -TCTTTTAATCTTCAACCATGGC-3' ,

reverse primer (AP4):

5' -CCAATGTGTGAAATCTGTAG-3' .

The size of the amplification product with primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) is about 483 base pairs (bp). The reaction mixture (Mix) 5x Mas^{DD}Taq Mix-2025 was used (Dialat Ltd., Russia).

Primer pairs F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) were synthesized by Evrogen (Russia) and provided in lyophilized form. The working concentration for the primers was 10 pmol/μl. F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) primer pairs were analyzed using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), studied their analytical characteristics (specificity and sensitivity).

The composition of the working reaction mixture for the PCR method (Table 1) was calculated for the number of samples under study and for the negative

Таблица 1
Состав рабочей реакционной смеси для проведения ПЦР

| № п/п | Наименование реактива | F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) | AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) |
|--|--------------------------|--|---------------------------------------|
| 1 | Реакционная смесь (Mix) | 10 | 5 |
| 2 | Деионизированная вода | 9,4 | 16,5 |
| 3 | Прямой праймер | 0,05 | 1 |
| 4 | Обратный праймер | 0,05 | 1 |
| 5 | ДНК фитоплазм | 2 | 1,5 |
| 6 | SynTaq ДНК-полимераза | 0,5 | – |
| Общий объем смеси на 1 образец (мкл) | | 22 | 25 |

контрольный образец без добавления ДНК (К-). Амплификацию осуществляли на приборах CFX-96 (Bio-Rad, США) и Veriti (Applied Biosystems, США). Визуализацию результатов амплификации с праймерами AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) проводили с помощью гель-электрофореза в 1,5%-м агарозном геле.

Для осуществления процесса амплификации использовали программу для пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), которая состояла из следующих этапов: 1) первичная денатурация при 95 °C – 5 мин; 2) повтор реакции в течение 49 циклов: 95 °C – 15 сек и 60 °C – 40 сек. Специфичная реакция проходит по каналу флуоресценции FAM, внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу флуоресценции HEX.

Программа амплификации для пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) следующая: 1) первичная денатурация при 95 °C – 5 мин; 2) циклическая реакция в течение 40 циклов: 95 °C – 10 сек, 58 °C – 15 сек, 72 °C – 45 сек; 3) финальная элонгация при 72 °C – 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведено изучение двух пар праймеров – F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) – для выявления фитоплазм из группы Apple proliferation и идентификации вида *Candidatus Phytoplasma mali* соответственно.

Авторы Nikolić et al. (2010) и Mehle et al. (2013) предлагают использовать для выявления фитоплазм из группы Apple proliferation видоспецифичные MGB-зонды (MGB – minor groove binder): AP-specific probe для идентификации вида *Candidatus Phytoplasma mali*; PD-specific probe – *Candidatus Phytoplasma pyri*; ESFY-specific probe – *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Преимуществами MGB-зондов являются

control sample without the addition of DNA (K-). Amplification was carried out on CFX-96 (Bio-Rad, USA) and Veriti (Applied Biosystems, USA) devices. Visualization of the results of amplification with primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) was performed using gel electrophoresis in 1.5% agarose gel.

To implement the amplification process, we used the program for a pair of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), which consisted of the following steps: 1) primary denaturation at 95 °C, 5 min; 2) repetition of the reaction for 49 cycles: 95 °C – 15 sec and 60 °C – 40 sec. Specific reaction passes through the FAM fluorescence channel,

internal positive control (IPC) – through the HEX fluorescence channel.

The amplification program for the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) is as follows: 1) primary denaturation at 95 °C, 5 min; 2) cyclic reaction for 40 cycles: 95 °C – 10 sec, 58 °C – 15 sec, 72 °C – 45 sec; 3) final elongation at 72 °C – 5 min.

RESULTS AND DISCUSSION

We studied two pairs of primers – F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) – to identify phytoplasmas from the Apple proliferation group and identify the species *Candidatus Phytoplasma mali* respectively.

Nikolić et al. (2010) and Mehle et al. (2013) suggest using species-specific MGB-probes (MGB – minor groove binder) to identify phytoplasmas from the Apple proliferation group: AP-specific probe to identify the species *Candidatus Phytoplasma mali*; PD-specific probe – *Candidatus Phytoplasma pyri*; ESFY-specific probe – *Candidatus Phytoplasma prunorum*.

Table 1
The composition of the working reaction mixture for PCR

| № | Reagent name | F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) | AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) |
|---|------------------------|--|---------------------------------------|
| 1 | Reaction mixture (Mix) | 10 | 5 |
| 2 | Deionized water | 9.4 | 16.5 |
| 3 | Forward primer | 0.05 | 1 |
| 4 | Reverse primer | 0.05 | 1 |
| 5 | Phytoplasma DNA | 2 | 1.5 |
| 6 | SynTaq DNA polymerase | 0.5 | – |
| The total volume of the mixture per 1 sample (µl) | | 22 | 25 |

прочное связывание с мишенью, более короткая нуклеотидная последовательность, специфичность, однако такие зонды не синтезируют в России и использование таких зондов увеличивает стоимость проведения анализа (Башмакова, 2017; Елшин, Петров, 2017). В связи с этим в исследованиях использовали 2,5-кратную реакционную смесь с красителем EVA Green (ООО «Синтол»).

Для изучения специфичности пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) использовали ДНК фитоплазм из различных групп: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа Apple proliferation), *Candidatus Phytoplasma solani* (группа Stolbur), *Candidatus Phytoplasma asteris* (группа Foxtail palm yellow decline), *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (группа Peanut witches' broom), *Candidatus Phytoplasma rubi* (группа Elm yellows). Результаты прохождения ПЦР со специфичными для группы Apple proliferation праймерами представлены на рисунках 2 и 3.

Результаты по изучению специфичности праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) показывают возможность их использования для диагностики фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation. Однако, помимо исследуемых видов фитоплазм из группы Apple proliferation, праймеры способны выявить ДНК других видов фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli*, *Candidatus Phytoplasma asteris*. Ингибирование реакции не наблюдалось по результатам реакции с внутренним положительным контролем (рис. 3), который проходил по каналу флуоресценции HEX. В ходе исследований по проверке пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) установлено, что эта пара праймеров может выявить штаммы следующих видов фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma australiense*, *Candidatus Phytoplasma solani*, X-disease phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, Paulownia witches' broom phytoplasma, *Candidatus phytoplasma malaysianum* и других из разных групп.

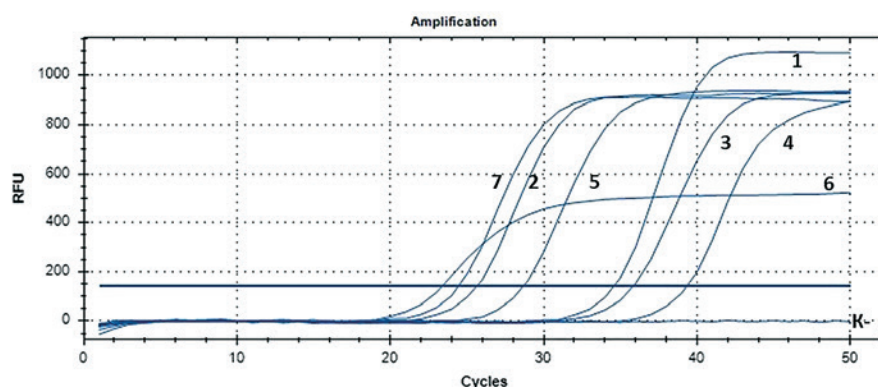


Рис. 2. Аналитическая специфичность праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), канал флуоресценции FAM: 1 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 2 – *Candidatus Phytoplasma mali*; 3 – *Candidatus Phytoplasma pyri*; 4 – *Candidatus Phytoplasma solani*; 5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*; 6 – *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7 – *Candidatus Phytoplasma asteris*; K – отрицательный контроль (H₂O) (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Fig. 2. Analytical specificity of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), FAM fluorescence channel: 1 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 2 – *Candidatus Phytoplasma mali*; 3 – *Candidatus Phytoplasma pyri*; 4 – *Candidatus Phytoplasma solani*; 5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*; 6 – *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7 – *Candidatus Phytoplasma asteris*; K – negative control (H₂O) (Bio-Rad CFX Manager 3.1 interface: Amplification; RFU – relative fluorescence unit; Cycles)

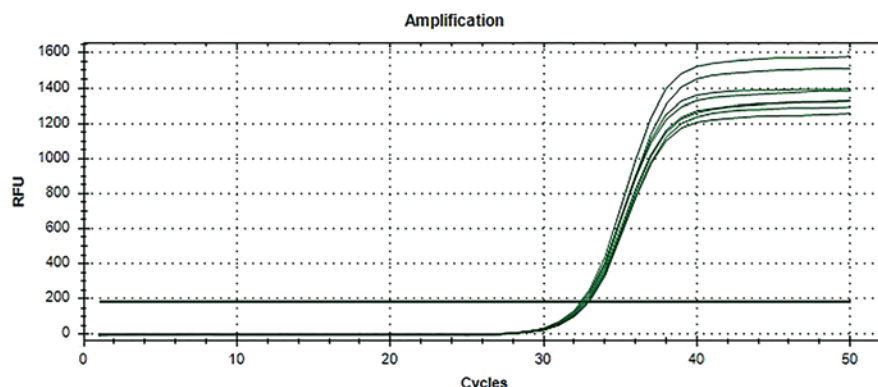


Рис. 3. Результаты прохождения внутреннего положительного контроля 2,5-кратной реакционной смеси с красителем EVA Green по каналу флуоресценции HEX (ООО «Синтол») (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Fig. 3. Results of passing the internal positive control of a 2.5-fold reaction mixture with EVA Green dye through the HEX fluorescence channel (Syntol) (Bio-Rad CFX Manager 3.1 interface: Amplification; RFU – relative fluorescence unit; Cycles)

The advantages of MGB probes are strong target binding, shorter nucleotide sequence, and specificity; however, such probes are not synthesized in Russia, and the use of such probes increases the cost of analysis (Bashmakova, 2017; Elshin and Petrov, 2017). In this regard, a 2.5-fold reaction mixture with the EVA Green dye (Syntol) was used in the studies.

To study the specificity of the F/R primer pair (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), phytoplasma DNA from different groups was used: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (Apple proliferation group),

Проанализировав данные, можно сделать вывод, что пару праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) рекомендуется использовать в качестве универсального теста для диагностики фитоплазм группы Apple proliferation и ряда других видов фитоплазм методом ПЦР-РВ. В случае получения положительного результата ПЦР-РВ, необходимо провести видовую идентификацию фитоплазм методом классической ПЦР с помощью праймеров, рекомендуемых в диагностических протоколах МСФМ 27 (2018) и РМ 7/62 (3) (2020), с последующим секвенированием продуктов амплификации. Таким образом, применение указанных праймеров возможно только для выявления фитоплазм, включая виды *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation.

Следующим этапом исследований было проведение проверки пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Исследование показало, что рассматриваемые праймеры могут выявить несколько изолятов фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation, которые депонированы в базу данных NCBI.

Далее осуществляли исследования по изучению аналитических характеристик пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) для идентификации возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali*. Результаты изучения аналитической специфичности праймеров с использованием ДНК разных видов фитоплазм представлены на рисунке 4.



Рис. 4. Электрофореграмма аналитической специфичности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994):
1 – *Candidatus Phytoplasma mali*;
2 – *Candidatus Phytoplasma pyri*;
3 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*;
4 – *Candidatus Phytoplasma solani*;
5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*;
K- – отрицательный контроль (H₂O);
M – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н.

Fig. 4. Electrophoregram of the analytical specificity of AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994):
1 – *Candidatus Phytoplasma mali*;
2 – *Candidatus Phytoplasma pyri*;
3 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*;
4 – *Candidatus Phytoplasma solani*;
5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*;
K- – negative control (H₂O);
M – molecular weight marker 100–3000 bp.

Candidatus Phytoplasma solani (Stolbur group), *Candidatus Phytoplasma asteris* (Foxtail palm yellow decline group), *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (Peanut witches' broom group), *Candidatus Phytoplasma rubi* (Elm yellows group). The results of PCR with primers specific for the Apple proliferation group are shown in Figures 2 and 3.

The results of studying the specificity of F/R primers (Nicolic et al., 2010; Mehle et al., 2013) show the possibility of their use for the diagnosis of phytoplasmas *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* from the Apple proliferation group. However, in addition to the studied phytoplasma species from the Apple proliferation group, primers are able to detect DNA of other phytoplasma species: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli*, *Candidatus Phytoplasma asteris*. Inhibition of the reaction was not observed as a result of the reaction with an internal positive control (Fig. 3), which passed through the HEX fluorescence channel. In studies testing the F/R primer pair (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) it was found that this pair of primers can detect strains of the following phytoplasma species: *Candidatus Phytoplasma australiense*, *Candidatus Phytoplasma solani*, X-disease phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, Paulownia witches' broom phytoplasma, *Candidatus phytoplasma malaysianum* and others from different groups.

Having analyzed the data, it can be concluded that the primer pair F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) is recommended to be used as a universal test for diagnosing phytoplasmas of the Apple proliferation group and a number of other phytoplasma species by RT-PCR. If a positive RT-PCR result is obtained, it is necessary to carry out species identification of phytoplasmas by classical PCR using the primers recommended in the diagnostic protocols ISPM 27 (2018) and PM 7/62 (3) (2020), followed by sequencing of the amplification products. Thus, these primers can only be used to detect phytoplasmas, including *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* from the Apple proliferation group.

The next stage of the study was to test the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). The study showed that the primers under consideration can reveal several isolates of *Candidatus Phytoplasma mali* phytoplasma from the Apple proliferation group, which are deposited in the NCBI database.

Further studies were carried out to study the analytical characteristics of the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) to identify the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*. The results of studying the analytical specificity of primers using DNA from different types of phytoplasmas are shown in Figure 4.

The desired amplification product of approximately 483 bp was obtained, sample 1 containing *Candidatus Phytoplasma mali* DNA (Fig. 4), which indicates

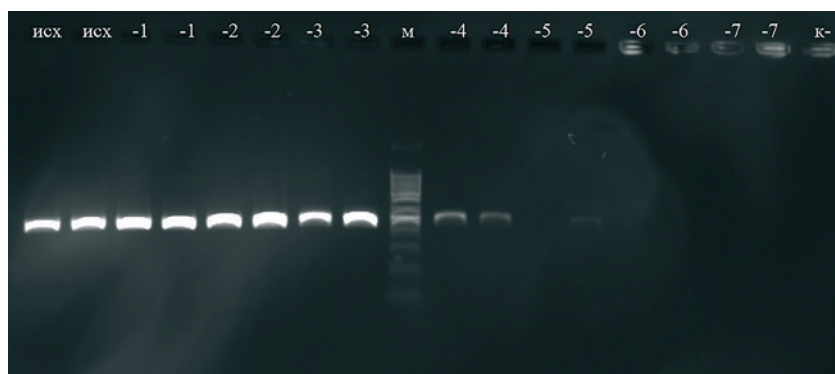


Рис. 5. Электрофореграмма аналитической чувствительности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием разведения ДНК *Candidatus Phytoplasma mali*: исх – исходная концентрация ДНК фитоплазмы; -1 – 10^{-1} ; -2 – 10^{-2} ; -3 – 10^{-3} ; -4 – 10^{-4} ; -5 – 10^{-5} ; -6 – 10^{-6} ; -7 – 10^{-7} ; К- отрицательный контроль (H_2O); М – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н.

Fig. 5. Electrophoregram of analytical sensitivity of AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994) using DNA dilution of *Candidatus Phytoplasma mali*: initial concentration of phytoplasma DNA; -1 – 10^{-1} ; -2 – 10^{-2} ; -3 – 10^{-3} ; -4 – 10^{-4} ; -5 – 10^{-5} ; -6 – 10^{-6} ; -7 – 10^{-7} ; K- negative control (H_2O); M – molecular weight marker 100–3000 bp

Получен необходимый продукт амплификации, равный примерно 483 п. н. у образца под номером 1 – ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* (рис. 4), что свидетельствует о специфичности пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994). ДНК других видов фитоплазм не была детектирована на электрофореграмме.

После изучения аналитической специфичности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) приступили к изучению их аналитической чувствительности. Для этого проводили 10-кратное разведение ДНК фитопатогенного микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali*, исходная концентрация ДНК равна 30,8 нг/мкл. Результаты исследования аналитической чувствительности представлены на рисунке 5.

По результатам изучения аналитической чувствительности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) видно, что более качественный продукт амплификации получен при разведении ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali* в 1000 раз (10^{-3}). Меньший продукт амплификации получен при разведении образца в 10 000 раз (10^{-4}). Реакция не стабильна при разведении ДНК фитоплазмы в 100 000 раз (10^{-5}). При дальнейших разведениях продукт амплификации отсутствовал, т. е. ДНК возбудителя пролиферации яблоно не была выявлена. Проведенный анализ праймеров показывает их высокую чувствительность, что важно при низкой концентрации ДНК фитоплазмы в зараженном материале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения достоверных результатов при изучении фитоплазм важно использовать наиболее чувствительные и точные молекулярно-генетические методы. Проведенный анализ праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) для выявления фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* показывает их низкую селективность в отношении исследуемых видов фитопатогенов. На основании полученных результатов данные праймеры

the specificity of the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994). DNA of other phytoplasma species was not detected on the electrophoregram.

Studying the analytical specificity of the AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994) was followed by studying their analytical sensitivity. For this, a 10-fold dilution of the DNA of the phytopathogenic microorganism *Candidatus Phytoplasma mali* was carried out, the initial DNA concentration was 30.8 ng/μl. The results of the study of the analytical sensitivity are shown in Figure 5.

According to the results of the study of the analytical sensitivity of primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994), it can be seen that a better amplification product was obtained by diluting the DNA of the microorganism *Candidatus Phytoplasma mali* by 1000 times (10^{-3}). A smaller amplification product was obtained by diluting the sample by 10,000 times (10^{-4}).

The reaction is not stable when the phytoplasma DNA is diluted 100,000 times (10^{-5}). At further dilutions, the amplification product was absent, i. e., the DNA of the causative agent of apple proliferation was not detected. The performed analysis of primers shows their high sensitivity, which is important at a low concentration of phytoplasma DNA in the infected material.

CONCLUSION

To obtain reliable results in the study of phytoplasmas, it is important to use the most sensitive and accurate molecular genetic methods. The analysis of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) for the detection of phytoplasmas *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* shows their low selectivity for the studied species of phytopathogens. Based on the results obtained, these primers are recommended to be used as a universal test for the diagnosis of phytoplasmas.

The species-specific primer pair AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) for identifying the causative agent of apple proliferation shows high specificity and sensitivity, which is important when studying phytoplasmas.

The data obtained can be used in further research to improve existing and develop new methods for diagnosing especially dangerous phytoplasmas from the Apple proliferation group.

Acknowledgement. The authors are grateful to PhD in Biology G.N. Bondarenko (FGBU “VNIIEK”), the Syntol team (Russia), the Valencian Institute for Agricultural Research (IVIA) team for providing materials for the study.

REFERENCES

1. Bashkirova I., Matyashova G., Gins M. Detection and identification of pathogens of phytoplasmoses of

рекомендуется использовать в качестве универсального теста для диагностики фитоплазм.

Видоспецифичная пара праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) для идентификации возбудителя пролиферации яблони показывает высокую специфичность и чувствительность, что важно при изучении фитоплазм.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях для усовершенствования существующих и разработки новых методов для диагностики особо опасных фитоплазм из группы Apple proliferation.

Благодарность. Авторы благодарны кандидату биологических наук Г.Н. Бондаренко (ФГБУ «ВНИИР»), коллективу ООО «Синтол» (Россия), коллективу Института сельскохозяйственных исследований Валенсии (Institut Valencia d'Investigacions Agraries, IVIA) за предоставление материалов для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башкирова И., Матяшова Г., Гинс М., 2018a. Выявление и идентификация возбудителей фитоплазмозов группы Apple proliferation на плодовых культурах. – Российская сельскохозяйственная наука, № 3: 10–14.
2. Башкирова И., Матяшова Г., Завриев С., Рязанцев Д., Шнейдер Ю., 2018b. Апробация тест-систем для детекции фитоплазм яблони и груши. – Защита и карантин растений, № 7: 40–41.
3. Башмакова Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.01.06. – Красноярск, 2017, 22 с.
4. Гирсова Н., Кастальева Т., Можаяева К. Методика определения фитоплазм с использованием молекулярных методов диагностики: ПЦР и ПДРФ. – М.: Россельхозакадемия, 2013, 23 с.
5. Елшин Н., Петров А., 2017. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах. – БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 17 (3): 173–179.
6. Каримова Е., Приходько Ю., Шнейдер Ю., 2019. Фитоплазмы – возбудители болезней косточковых плодовых культур. – Защита и карантин растений, № 5: 35–39.
7. Матяшова Г., Морозова О. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя истощения груши *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline). – М.: ВНИИР, 2016, 39 с.
8. МСФМ 27. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы. – 2018, 18 с.
9. Приходько Ю., Матяшова Г. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation). – М.: ВНИИР, 2015, 80 с.
10. Свиридова Л., Ванькова А., 2012. Микоплазмы – патогены растений. – Нива Поволжья, № 4 (25): 26–32.
11. Шнейдер Ю., Приходько Ю., Шнейдер Е., Кулешова Ю. Оценка фитосанитарных рисков the Apple proliferation group on fruit crops [Vyyavleniye i identifikatsiya vozbuditeley fitoplazmozov gruppy Apple proliferation na plodovykh kulturakh]. *Russian agricultural science*, 2018a; 3: 10–14 (in Russian).
12. Bashkirova I., Matyashova G., Zavriev S., Ryzantsev D., Shneyder Yu. Approval of the test systems for the detection of the apple and pear phytoplasma. *Plant protection and quarantine*, 2018b; 7: 40–41.
13. Bashmakova E. Detection of single nucleotide polymorphisms based on derivatives of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin [Vyyavleniye odnonukleotidnykh polimorfizmov na osnove proizvodnykh Ca^{2+} -reguliruyemogo fotoproteina obelina]: extended abstract of Cand. Biol. Sci. Dissertation: 03.01.06. Krasnoyarsk, 2017, 22 p. (in Russian).
14. Girsova N., Kastalyova T., Mozhaeva K. Method for determining phytoplasmas using molecular diagnostic methods: PCR and RFLP [Metodika opredeleniya fitoplazm s ispol'zovaniyem molekulyarnykh metodov diagnostiki: PCR i RFLP]. M.: Rosselkhozakademiya, 2013, 23 p. (in Russian).
15. Elshin N., Petrov A. Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures [Izucheniye vozmozhnosti ispol'zovaniya metoda qPCR dlya kontrolya ot-sut'stviya mikoplazmennoy kontaminatsii v kletochnykh kulturakh]. – *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017; 17 (3): 173–179 (in Russian).
16. Karimova E., Prikhodko Yu., Shneyder Yu. Phytoplasma – pathogenic agents of stone fruit crops diseases [Fitoplazmy – vozbuditeli bolezney kostochkovykh plodovykh kultur]. *Plant Protection and Quarantine*, 2019; 5: 35–39 (in Russian).
17. Matyashova G., Morozova O. Guidelines for the detection and identification of the causative agent of pear depletion *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline) [Metodicheskiye rekomendatsii po vyyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya istoshcheniya grushi *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline)]. M.: VNIIR, 2016, 39 p. (in Russian).
18. ISPM 27. International standards for phytosanitary measures. Diagnostic protocols for regulated pests. DP 12: Phytoplasmas. 2018, 18 p.
19. Prikhodko Yu., Matyashova G. Guidelines for the detection and identification of the causative agent of apple proliferation *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation) [Metodicheskiye rekomendatsii po vyyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya proliferatsii yablони *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation)]. M.: VNIIR, 2015, 80 p.
20. Sviridova L., Vankova A. Mycoplasmas are plant pathogens [Mikoplazmy – patogeny rasteniy]. *Niva Povolzhya*, 2012; 4 (25): 26–32 (in Russian).
21. Shneyder Yu., Prikhodko Yu., Shneyder E., Kuleshova Yu. Assessment of pest risk analysis associated with import, export and movement of seedlings, rootstocks and cuttings of stone fruit crops [Otsenka fitosanitarnykh riskov vrednykh organizmov, svyazannykh s importirovaniyem, eksportirovaniyem i peremeshcheniyem sazhentsev, podvoyev i cherenkov kostochkovykh plodovykh kultur] (ed. by T.V. Artemyeva). M.: VNIIR, 2017, 503 p.

вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением саженцев, подвоев и черенков косточковых плодовых культур (под ред. Т.В. Артемьевой). – М.: ВНИИКР, 2017, 503 с.

12. Bashkirova I., Bondarenko G., Kornev K., 2019. Study of methods for detecting quarantine phytoplasma's from the apple proliferation group on the territory of Russia. – *Phytopathogenic Mollicutes*, 9 (1): 211–212. URL: <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00106.3>.

13. Duduk B. Molecular characterization of phytoplasmas detected in agronomically relevant crops in Serbia. – 2009, 127 p.

14. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group, 2004. Correspondence G. Firrao. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, № 54: 1243–1255. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02854-0>.

15. Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J.M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. – *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8): 2916–2923. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2916-2923.1994>.

16. Jomantiene R., Davis R.E., Valiunas D., Alminaitė A., 2002. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit interoperon sequence heterogeneity. – *European Journal of Plant Pathology*, 108 (6): 507–517. URL: <https://doi.org/10.1023/A:1019982418063>.

17. Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes. – *Annual Review of Microbiology*, 54 (1): 221–255. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>.

18. Mehle N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M., 2013. Real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from apple proliferation group. – *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*, Vol. 938: 269–281. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_23.

19. Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapic V., Dermastia M., 2011. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. – *Phytopathogenic Mollicutes*, 1 (2): 65–76. URL: <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.2.012>.

20. Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar R., Dermastia M., 2010. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. – *Molecular and Cellular Probes*, 24 (5): 303–309. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.06.005>.

21. Picard C., Afonso T., Benko-Beloglavec A., Karadjova O., Matthews-Berry S., Paunovic S.A., Pietsch M., Reed P., van der Gaag D.J., Ward M., 2018. Recommended regulated non-quarantine pests (RNQPs), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 48 (3): 552–568. URL: <https://doi.org/10.1111/epp.12500>.

22. PM 7/62 (3), 2020. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum'. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 50 (1): 69–85.

23. Seemüller E., Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and

12. Bashkirova I., Bondarenko G., Kornev K. Study of methods for detecting quarantine phytoplasma's from the apple proliferation group on the territory of Russia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2019; 9 (1): 211–212. URL: <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00106.3>.

13. Duduk B. Molecular characterization of phytoplasmas detected in agronomically relevant crops in Serbia. 2009, 127 p.

14. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. Correspondence G. Firrao. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004; No. 54: 1243–1255. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02854-0>.

15. Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J.M. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994; 60 (8): 2916–2923. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2916-2923.1994>.

16. Jomantiene R., Davis R.E., Valiunas D., Alminaitė A. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology*, 2002; 108 (6): 507–517. URL: <https://doi.org/10.1023/A:1019982418063>.

17. Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 2000; 54 (1): 221–255. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>.

18. Mehle N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M. Real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from apple proliferation group. *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*, 2013; Vol. 938: 269–281. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_23.

19. Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapic V., Dermastia M. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2011; 1 (2): 65–76. URL: <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.2.012>.

20. Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar R., Dermastia M. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes*, 2010; 24 (5): 303–309. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.06.005>.

21. Picard C., Afonso T., Benko-Beloglavec A., Karadjova O., Matthews-Berry S., Paunovic S.A., Pietsch M., Reed P., van der Gaag D.J., Ward M. Recommended regulated non-quarantine pests (RNQPs), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2018; 48 (3): 552–568. URL: <https://doi.org/10.1111/epp.12500>.

22. PM 7/62 (3). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum'. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2020; 50 (1): 69–85.

23. Seemüller E., Schneider B. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54: 1217–1226. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02823-0>.

24. Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58: 2368–2377. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>.

25. Weintraub P.G., Beanland L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. – *Annual Review of Entomology*, Vol. 51: 91–111. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.

26. Woese C., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 97: 8392–8396. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>.

27. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 19.05.2022).

28. The National Center for Biotechnology Information. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 21.04.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Башкирова Ида Геннадьевна, младший научный сотрудник – и. о. начальника научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант ФГАОУ ВО «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirova@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

Смирнова Ирина Павловна, доктор биологических наук, заслуженный профессор ФГАОУ ВО «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0002-3584-9130, e-mail: smir-ip@yandex.ru.

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004; Vol. 54: 1217–1226. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02823-0>.

24. Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008; Vol. 58: 2368–2377. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>.

25. Weintraub P.G., Beanland L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 2006; Vol. 51: 91–111. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.

26. Woese C. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000; Vol. 97: 8392–8396. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>.

27. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 19.05.2022).

28. The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (last accessed: 21.04.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ida Bashkirova, Junior Researcher, Acting Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; postgraduate student of FGAOU VO “RUDN University”, Moscow, Russia; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirova@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

Irina Smirnova, Advanced Doctor in Biology, Honored Professor of FGAOU VO “RUDN University”, Moscow, Russia; ORCID 0000-0002-3584-9130, e-mail: smir-ip@yandex.ru.